

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-130871

(P2003-130871A)

(43) 公開日 平成15年5月8日(2003.5.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
33/543	5 1 1	33/543	5 1 1 F
33/574		33/574	A

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2001-331184(P2001-331184)

(22) 出願日 平成13年10月29日(2001.10.29)

(71) 出願人 390014960

シスメックス株式会社

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

(72) 発明者 小林 弘典

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(72) 発明者 石原 英幹

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(74) 代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(54) 〔発明の名称〕 タンパク量の測定法

(57) 【要約】

【課題】短時間および少ない工程で行う多項目のタンパク量の測定法の提供。

【解決手段】以下の工程：(1)組織もしくは細胞を可溶化させて調製した試料液を、1以上のウェルを有し、ウェルの底部に疎水性多孔性膜を配置したプレート中のウェルに注入し、プレートの疎水性多孔性膜側から吸引することにより試料中のタンパクを該膜に固相形成させ、(2)標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつ測定目的のタンパクと特異性を有する第1抗体を該ウェル中に注入し、測定目的のタンパクと結合させ、(3)洗浄処理を行い未反応第1抗体を除去し、(4)標識化されていない第1抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化し、(5)測定目的のタンパクに結合した標識の量を測定し、(6)予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて、目的タンパク量を算出することからなるタンパク量の測定法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 以下の工程：

(1) 組織もしくは細胞を可溶化させて調製した試料液を、1以上のウェルを有し、ウェルの底部に疎水性多孔性膜を配置したプレート中のウェルに注入し、プレートの疎水性多孔性膜側から吸引することにより試料中のタンパクを該膜に固相形成させ、(2) 標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつ測定目的のタンパクと特異性を有する第1抗体を該ウェル中に注入し、測定目的のタンパクと結合させ、(3) 洗浄処理を行い未反応第1抗体を除去し、(4) 標識化されていない第1抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化し、(5) 測定目的のタンパクに結合した標識の量を測定し、(6) 予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて、目的タンパク量を算出することからなるタンパク量の測定法。

## 【請求項2】 以下の工程：

(1) 組織もしくは細胞を可溶化させて調製した試料を、1以上のウェルを有し、ウェルの底部に疎水性多孔性膜を配置したプレート中のウェルに注入し、プレートの疎水性多孔性膜側から吸引することにより試料中のタンパクを該膜に固相形成させ、(2a) 測定目的のタンパクと特異性を有する第1抗体を該ウェル中に注入し、測定目的のタンパクと結合させ、(3) 洗浄処理を行い未反応第1抗体を除去し、(3a) 標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつ該第1抗体と特異性を有する第2抗体を該ウェル中に注入し、該第1抗体と結合させ、(4a) 標識化されていない第2抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化し、(5) 測定目的のタンパクに結合した標識の量を測定し、(6) 予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて、目的タンパク量を算出することからなるタンパク量の測定法。

【請求項3】 プレートが2以上のウェルを有する請求項1または2による方法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一つによる方法により測定し、得られたタンパク量に基づいて疾患を診断する方法。

【請求項5】 疾患が、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌、食道癌、前立腺癌、肝癌、腎臓癌、膀胱癌、皮膚癌、子宮癌、脳腫瘍、骨肉種または骨髄腫瘍である請求項4の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中に含有される多項目の微量タンパクの量を、簡便で短時間に測定する方法である。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 癌などの疾患に罹ると、動物の体内では特定の微量タンパク

の量が減少したり増加する現象が見られる。従って、疾患の種類や重篤度合いと、増減するタンパクの種類に相関関係が見出される場合、動物の体内の該タンパクの存在の量を測定することにより疾患の識別や悪性度の診断に用いられることが考えられる。従来、組織から得られる可溶化液中に微量に含まれるタンパクの定量には、ELISA法やウエスタンブロット法を用いられることが知られている。

【0003】 ELISA法は、目的とするタンパクに特異的に結合する第1抗体と、第1抗体とは相違するが同様に目的タンパクに特異的に結合する第2抗体との2種類の抗体を必要とする方法である。より詳細には、第1抗体をマイクロタイタープレート中のウェルや多孔性膜または微粒子などの固相支持体上に固定化し、そこへタンパク含有試料と反応させると、第1抗体と、それに対応するタンパクとが結合する。次いで、容易にアッセイできる酵素で標識され、かつ目的タンパクに特異性を有する第2抗体をさらに反応させると、第1抗体と結合したタンパクに、第2抗体が結合する。その後、予め第2抗体に標識化された酵素に、その酵素の基質を反応させ、得られる生成物の量を測定することにより、目的とするタンパクの量が測定できるという原理である。

【0004】 しかし、上記のようにELISA法では、1つの検出目的タンパク（抗原）に対し抗原と結合する結合部位が異なり、かつ互いに影響を及ぼさない独立した特異的抗体（第1抗体および第2抗体）が2つ必要である。また2回の免疫反応を行うため時間もかかる。

【0005】 一方、ウエスタンブロット法は、目的タンパクを含む試料を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画した後、ニトロセルロース膜やPVDF膜などの多孔性膜に転写し、この膜上で抗原抗体反応を行うことにより特定のタンパクを検出・同定する方法である。より詳細には、ニトロセルロース膜上に転写されたタンパクへ、該タンパクに特異的に結合する第1抗体を反応させると、タンパクと第1抗体が結合する。次いで、容易にアッセイできる酵素を共有結合的に結合し、かつ第1抗体と特異的に結合する第2抗体をさらに反応させると、第1抗体と結合したタンパクに第2抗体が結合する。ELISA法と同様、第2抗体に結合した酵素に、その基質を反応させ、得られる生成物を検出することによりタンパクの存在が検出され、その生成物の量を測定することにより、目的とするタンパクの量が測定できるという原理である。

【0006】 容易にアッセイできる酵素を共有結合的に結合し、かつ第1抗体に特異的に結合する第2抗体の代わりに、放射性同位体や蛍光物質で標識し、かつ第1抗体に特異的に結合する第2抗体を用いることもできる。この際、予め第2抗体に結合した酵素に、酵素反応を行わせる代わりに、放射性同位体の存在や量をオートラジオグラフィーで測定したり、蛍光物質の存在や量を蛍光

検出機で測定し、得られた結果から目的とするタンパクの検出または量を算出する。

【0007】しかし、上記のようにウエスタンブロット法は、被検体を電気泳動し、ゲル上のタンパクの分子量ごとに分画された状態を多孔性膜に転写するという手順があり、それぞれに時間を要し煩雑である。また、電気泳動用に陰イオン性の界面活性剤（SDS）の入ったSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いる場合、SDSの結合量が一般的なタンパクと若干異なるため、ゲル上の分画によって得られる分子量と実際の分子量とが異なる場合があり、したがって分離されたタンパク分画のどれが目的タンパクであるかどうかを同定するには信頼性が低くなる。

【0008】さらに、転写を行うことで分画されたタンパクのバンドが、バンドに含まれるタンパクの濃度に線形的に多孔性膜に転写されるかどうかを保証できないため、転写されたタンパクのバンドは定量性に欠ける。さらに、電気泳動後も、転写された多孔性膜上のタンパクに、抗原抗体反応を2段階行う必要があるため、方法全体に要する時間が約十数時間と長い。

【0009】一方、多孔性ニトロセルロース膜に目的とするタンパクと特異的に結合する抗原タンパクの精製物を直接固定化するウエスタンブロット法の変法である固相酵素免疫検定法（特開平1-223352）が報告されている。この方法では、該膜上に固定化された抗原タンパクに、目的とするタンパクを含む試料を反応させ、抗原タンパクと目的タンパクを結合させる。次いで、結合した目的タンパクと特異的に結合し、かつ容易にアッセイできる酵素を共有結合的に結合した抗体をさらに反応させると、抗原タンパクと結合した目的タンパクに抗体が結合する。

【0010】ELISA法と同様、予め抗体に結合した酵素に、その基質を反応させ、得られる生成物の存在を検出することにより、抗体と結合した目的タンパクが検出できるという原理である。この方法では、ELISA法やウエスタンブロット法に比べて免疫反応の回数は減らされたため、方法は簡易化され、したがって短時間で行うことができる。

【0011】しかし、この方法では、直接タンパクを膜に固定化するが、そのタンパクは定量目的のタンパクの特異的抗原であり、定量目的のタンパクそのものではない。したがって、1つの検出目的タンパクと対応する特異的抗原が1種類と、さらに目的タンパクと対応する別の特異的抗体を1種類必要とする。

【0012】以上のように、検出目的のタンパクを含む試料は、ウエスタンブロット法のように、予め電気泳動で分画されるか、ELISA法のように固相に目的タンパクに対応する特異的抗体を固定化させた後に第2の特異的抗体と反応させるか、特開平1-223352号に記載の方法のように、多孔性膜に目的タンパクに対する

特異的抗原を固定化させた後に第2の特異的抗原反応させるように、前処理段階や、検出目的タンパクに対して2以上の特異的抗体または抗原が必要であった。

【0013】したがって、短時間で少ない工程で多項目の目的微量タンパクの定量を行うことができ、かつ検出目的タンパクに対して1種類のみの特異的抗体を用いるタンパクの定量方法、すなわち試料中に含有される定量目的のタンパクを直接検出または定量する方法の開発が、望まれていた。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、疎水性多孔性膜に組織もしくは細胞由来を可溶化させて調製した試料を直接、固相形成させることによる、短時間で少ない工程で行える、多項目の微量タンパクの量の測定法が提供される。具体的には、本発明によれば、細胞や組織全体から採取されたバイオプシー検体を可溶化処理した試料を直接、疎水性多孔性膜に直接、固相形成させるので、煩雑な試料の精製処理が不要である。また、本発明によれば、測定目的のタンパクに特異性を有する抗体を1種類のみ用いるため、測定法に要するコストが低減化でき、かつ測定目的タンパクに行う反応の数を減少させることができるので、本発明の方法は短時間に行うことができる。また、本発明によれば、1以上のウェルを有するプレートを用いて疎水性多孔性膜に試料を1以上固相形成させるので、同一試料に関して多項目のタンパクの定量を行うことや、多数の試料に関して同一項目のタンパクの定量を行うことができる。

【0015】詳細には、本発明によれば、以下の工程：  
（1）組織もしくは細胞を可溶化させて調製した試料液を、1以上のウェルを有し、ウェルの底部に疎水性多孔性膜を配置したプレート中のウェルに注入し、プレートの疎水性多孔性膜側から吸引することにより試料中のタンパクを該膜に固相形成させ、（2）標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつ測定目的のタンパクと特異性を有する第1抗体を該ウェル中に注入し、測定目的のタンパクと結合させ、（3）洗浄処理を行い未反応第1抗体を除去し、（4）標識化されていない第1抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化し、（5）測定目的のタンパクに結合した標識の量を測定し、（6）予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて、目的タンパク量を算出することからなるタンパク量の測定法が提供される。

【0016】さらに本発明は、本発明のタンパク量の測定法により得られた結果に基づいて、癌などの疾患を診断する方法を提供する。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、以下の工程に従い、行うことができる。まず、試料を調製する。試料は、例えば細胞や組織を、界面活性剤、タンパク分解

酵素阻害剤等を含む緩衝液中で、ワーリングブレンダーや超音波を使用し、粉碎、可溶化して調製する。

【0018】界面活性剤は、細胞膜や核膜を破壊して細胞内物質を取り出し、可溶化された細胞を調製するために用いる。その例としては、ノニデットP-40、トリトンX-100、デオキシコール酸、CHAPS等が挙げられる。界面活性剤濃度は、1w/v%以下が好ましい。

【0019】タンパク分解酵素阻害剤は、細胞膜や核膜が破壊された細胞内物質が混在するときにタンパクが破壊されるのを防ぐために用いる。その例は、EDTA、EGTAのようなメタロプロテアーゼ阻害剤、PMSF、トリアシンインヒビター、キモトリプシンのようなセリンプロテアーゼ阻害剤および/またはヨードアセトアミド、E-64のようなシステインプロテアーゼ阻害剤の混合物や、シグマ社から市販のプロテアーゼ阻害剤カクテルのようなそれらタンパク分解酵素阻害剤の予め混合された市販品が挙げられる。

【0020】細胞を可溶化した後、組織もしくは細胞の溶解液から遠心分離やフィルターを用いたろ過などにより不溶物を除去する。次に、本発明の方法でタンパクの定量を行うにあたり、処理された組織もしくは細胞の溶解液中の全タンパク量を当業者に公知の方法に従って測定しておくのが望ましい。総タンパク量は、例えば、DCタンパクキット等を用いて、ウシIgGを標準として測定される。

【0021】次いで、総タンパク量を測定した、組織もしくは細胞を可溶化させて調製した試料を、1以上のウェルを有し、底部に疎水性多孔性膜を配置したプレート中のウェルに注入し、プレートの疎水性多孔性膜側から陰圧で吸引することにより試料中のタンパクを該膜に固相形成させる。

【0022】疎水性多孔性膜としては、タンパクと疎水結合することができるもの、具体的には、PVDF（ポリビニリデンフロライド）疎水性メンブレン、ナイロン（荷電処理済み）メンブレン、ニトロセルロース等が挙げられる。

【0023】ウェルの底の疎水性多孔性膜の孔は、0.1~10 $\mu$ m、好ましくは0.1~0.5 $\mu$ mである。プレートの疎水性多孔性膜側からの吸引は、約50~1000mmHg、好ましくは約100~300mmHgの圧力で、約5~120秒間行うことができる。ウェルの底の大きさとしては、ウェルの底面積の総和と、膜側からの陰圧での吸引のしやすさ等を考慮に入れて選択することができる。

【0024】タンパクを疎水性多孔性膜上に固相形成させる場合、疎水性多孔性膜の孔がタンパクより大きくても、タンパクは膜との間の疎水性結合などにより保持されるので、タンパクは疎水性多孔性膜を通過しない。なお、該疎水性多孔性膜としては、トランスファーバッ

ファー（48mMトリス、39mMグリシン、20%メタノール、SDSおよび80%水）への浸漬などの初期化処理を行ったものを用いるのが好ましい。

【0025】ウェルに分注する試料の量は、該試料中に含まれる総タンパクの量と、定量目的のタンパクの種類を考慮して当業者には容易に決定することができる。この際、ウェルの底の所定の面積の疎水性多孔性膜上に、固相形成可能な量より少ない量のタンパクを含む試料を各ウェルに分注するのが好ましい。試料中に含まれる定量目的のタンパクの量がウェルの底の所定の面積の疎水性多孔性膜上に、固相形成可能な量より多いと予想される場合には、例えば、試料をトリスバッファー、リン酸バッファー、水のような希釈液で希釈し、ウェルに分注する試料の中に含まれる総タンパクの量が疎水性多孔性膜の所定面積当たりに固相形成可能な量以下になるように調整して用いることができる。

【0026】例えば、総タンパク量が1 $\mu$ g/mlのHeLa細胞の可溶化された試料を試料として用い、ウェルの底面積が24mm<sup>2</sup>で、定量目的のタンパクがCdk2、Cdk4、CyclinE、P16、P21、P27、C-mycなどであるときには、分注する試料の量は、1つのウェルあたり約100 $\mu$ lである。

【0027】他方、定量目的のタンパクがアクチンの場合、総タンパク量が0.5 $\mu$ gのHeLa細胞の可溶化された試料を用い、ウェルの底面積が24mm<sup>2</sup>であるときには、1つのウェルあたり約100 $\mu$ l分注する。この際、HeLa細胞の可溶化された試料中に含まれるアクチンの量は、他の定量目的のタンパクに比べて含有量が多いので、該試料は、トリスバッファー、リン酸バッファー、水のような希釈液で希釈して、総タンパク量を調節することができる。

【0028】プレートは、ウェルを1以上有するのが好ましい。1以上設けられていると、同一試料をウェルの底の疎水性多孔性膜に固相形成させた後、異なるタンパクに特異性を有する第1抗体を各ウェルに注入し、1種類の試料について多項目のタンパクを定量することができる。また、異なる試料を各ウェルの底の疎水性多孔性膜に固相形成させた後、同一タンパクに特異性を有する第1抗体を各ウェルに注入し、多種類の試料について1項目のタンパクを定量することもできる。

【0029】プレートの1以上のウェルには、定量目的のタンパクの純品を、濃度勾配をつけて分注してもよい。たとえば、図1に示すようにウェルが1列に6つあり、そこに定量目的のタンパクを固相形成させる際には、定量目的のタンパクを0ng（バックグラウンドとして目的タンパクを含まない）、5ng、12.5ng、25.0ng、37.5ngおよび50ng含むスタンダード系列1を分注したウェルを用意する。このように、定量目的のタンパクの純品を同一プレート中に固相形成させた場合は、同一プレート内に固相形成された定

量されるべき試料2〜7と同一条件下に処理されるので、濃度勾配を有するタンパクの純品から得られた結果を基にした検量線は非常に精度の高いものとなり、好ましい(図1参照)。

【0030】疎水性多孔性膜上に固相形成されたタンパクのうち、抗体との反応工程で非特異的に外部因子と結合して、測定誤差を生じるのを避けるために、任意に、ウェル中にブロッキング液を分注する。この工程は、試料中に含有されるタンパクを疎水性多孔性膜に固相形成させた後に行うのが好ましい。

【0031】ブロッキング液は、定量目的タンパクがCdk2やP16の場合は、50%Block ace、タンパクがアクチン、Cdk4、CyclinE、P53、P21、P27、C-mycの場合は、TBS-T (Tris Buffered Saline Tween) や4%BSA (ウシ血清アルブミン) を用いることができる。ウェルにブロッキング液を分注後、0〜60分間室温で静置して反応させ、その後、プレートの疎水性多孔性膜の側から前述のように膜を陰圧で吸引して除去する。

【0032】次いで、標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつ測定目的のタンパクと特異性を有する第1抗体を該ウェル中に注入し、測定目的のタンパクと結合させる。標識化されている抗体とは、当該分野で公知の標識化された抗体を用いることができる。詳細には、標識蛍光物質で標識化されたか、または標識酵素で標識化された抗体を意味する。

【0033】標識蛍光物質としては、フルオレセイン、クマリン、エオシン、フェナントロリン、ビレン、ローダミンなどが挙げられる。そのうち、フルオレセインが好ましい。標識酵素としては、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼが挙げられる。そのうち、ペルオキシダーゼが好ましい。

【0034】標識との反応部位を有する抗体とは、当該分野で公知の標識との反応部位を有する抗体を挙げることができる。標識物質FITC (フルオレセインイソチアシアナート) の場合の抗体との反応部位は、FITCのイソチオシアナート部分が抗体のアミノ基と反応して結合し、フルオレセインが該抗体に標識される。抗体としては、ヤギ、ウサギ、ネズミ、ブタ、ヒツジ、ニワトリなど由来の抗体を用いることができる。

【0035】各ウェルに第1抗体を注入し、15〜30分間室温で反応させて第1抗体を測定目的のタンパクに結合させる。その後プレートの疎水性多孔性膜の側から前述のように膜を陰圧で吸引してその溶液を除去する。第1抗体は溶液の形態で用いられることができ、トリス塩酸緩衝液(pH7.4)中の溶液の形態で用いられるのが好ましく、その溶液は、さらに、塩化ナトリウム、ATPおよびDTTを含むことができる。溶液に含まれる第1抗体の量は、先に測定した試料中の総タンパクの量を考慮し、ウェルの底の疎水性多孔性膜毎に固相形成

されていると予想される測定目的タンパク量より多い量がウェルに供給できるように適宜調節する。

【0036】次いで、洗浄処理を行い、未反応第1抗体を除去する。具体的には、ウェルに洗浄液を注入し、プレートの疎水性多孔性膜の側から上述のように膜を吸引して洗浄液を除去する。

【0037】洗浄液としては、TBS-T (250mM トリス、150mM塩化ナトリウム、0.05%トゥーイン20) などを用いることができる。洗浄の工程は、1回以上、複数回行う。

【0038】標識を持たない第1抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化させる。具体的には、第2次抗体として市販のビオチン化抗体を用いる場合には、検出可能な標識を持つアビジン(例えば、FITC標識アビジン、HRP標識アビジン、ローダミン標識アビジン等)をビオチン化抗体と反応させ、検出することが可能である。

【0039】次いで、測定目的のタンパクに結合した標識の量を測定する。標識に応じて当該分野で公知の方法に従い、標識の量を測定する。詳細には、プレートから疎水性多孔性膜を取り外して、ウェルで区画された該膜上に固定された、標識の量を測定する。

【0040】より詳細には、第1抗体が標識蛍光物質で標識化された場合、該標識蛍光物質からの蛍光量を測定する。具体的には、標識蛍光物質をある特定の波長で励起させて、蛍光画像解析装置で検出する。照射する光の波長は標識蛍光物質によって異なるが、例えば、標識蛍光物質が、フルオレセインであるときは488nmの波長を照射して励起させる。

【0041】第1抗体が標識酵素で標識化された場合、該標識酵素に、該標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質が生じるような基質を作用させて、生じた生成物の量を光学的に測定する。標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質とは、標識酵素と反応でき、蛍光、吸光度、散乱光強度、透過光強度等を測定することによってその存在を検出できるような物質を意味し、例えば、ECレプラス、TMB (テトラメチルベンジン) などの色素、ルシフェリンなどが挙げられる。そのうち、ECレプラスが好ましい。具体的には、標識酵素がペルオキシダーゼであるときには、標識酵素との反応によって光学的に検出可能な物質はECレプラスが挙げられる。なお、標識酵素の基質は、使用する標識酵素に合わせて適宜選択することができる。

【0042】次いで、予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて目的タンパク量を算出する。抗体が標識蛍光物質で標識化された場合、測定した蛍光量を、予め作製した既知量の純品タンパクを同様に処理して得られた蛍光量と、そのタンパクの量との検量線に、得られた蛍光量をあてはめることにより疎水性多孔性膜上に固相形成された組織もしくは細胞の可溶化試料中に含まれ

る目的タンパクの量を算出することができる。抗体が標識酵素で標識化された場合、該標識酵素との反応によって生じた生成物の量を、前記と同様に予め作製した検量線に得られた測定値をあてはめることにより疎水性多孔性膜上に固相形成された組織もしくは細胞の可溶化試料中に含まれる目的タンパク量を算出することができる。

【0043】標識の量を測定する際、測定目的のタンパクに応じた特異性を有する標識化抗体が、場所を異にするウエルで反応している場合、それらは同一標識のため、その蛍光を検出するための蛍光検出機は1種類の励起波長のみを用いることで複数種類の目的のタンパクを測定することができるので、より好ましい。

【0044】さらに本発明により、以下の工程：

(1) 組織もしくは細胞を可溶化させて調製した試料を、1以上のウエルを有し、ウエルの底部に疎水性多孔性膜を配置したプレート中のウエルに注入し、プレートの疎水性多孔性膜側から吸引することにより試料中のタンパクを該膜に固相形成させ、(2a) 測定目的のタンパクと特異性を有する第1抗体を該ウエル中に注入し、測定目的のタンパクと結合させ、(3) 洗浄処理を行い未反応第1抗体を除去し、(3a) 標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつ該第1抗体と特異性を有する第2抗体を該ウエル中に注入し、該第1抗体と結合させ、(4a) 標識化されていない第2抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化し、(5) 測定目的のタンパクに結合した標識の量を測定し、(6) 予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて、目的タンパク量を算出することからなるタンパク量の測定法が提供される。

【0045】標識化されているか、または標識との反応性部位を有する第2抗体は、上記第1抗体と同様の標識化および標識との反応性部位を用いることができる。第2抗体は、第1抗体に特異性を有するものであれば、測定目的のタンパク毎に異なるものを用いる必要はなく、したがって、多項目のタンパクを測定する際にも、共通の第2抗体を用いてもよい。第1抗体が1種類であれば、その第1抗体に特異性を有する第2抗体は1種類でよい。

【0046】また、本発明は、本発明の方法により測定したタンパク量の結果により、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌、食道癌、前立腺癌、肝癌、腎臓癌、膀胱癌、皮膚癌、子宮癌、脳腫瘍、骨肉腫または骨髄腫瘍のような癌疾患を診断する方法を提供する。例えば、アクチン、Cdk2、Cdk4、CyclinE、P16、P21、P27、C-myc等のタンパクの量が増減すると、患者は胃癌や大腸癌に罹患している可能性がある。

【0047】また、本発明の方法は、図2に示したような、複数の貫通されたウエル21を有し、一端に液体供給路22が設けられたプレート23と、ウエルの底部に配置された疎水性多孔性膜24とからなる1ユニットを

複数個備え、プレートと疎水性多孔性膜とがそれぞれ離脱可能に設けられた支持体と、液体供給路からウエルに供給された液体をウエルの底部方向に吸引するための吸引機構25とからなる試料測定装置を用いて好適に行うことができる。

【0048】この試料測定装置は、具体的には以下のようにして本発明の方法を行う際に用いることができる。試料測定装置のウエル中に、試料液や標品液を注入し、吸引機構を用いてウエルの底部方向に陰圧で吸引して、ウエルから液体を除去する。具体的には、吸引機構例えば、固相廃液管26に接続する吸引溝27と、オーバーフロー廃液管28に接続する排水溝29とを経て陰圧で吸引されることにより、ウエル内の液体は除去される。その結果、疎水性多孔性膜上には、試料液や標品液中のタンパク等が固相形成される。ウエルの底部の疎水性多孔性膜上にタンパク等が固相形成された、試料測定装置のウエルに、抗体を含む溶液を注入し、所定の条件下で放置することによりウエル中で抗原抗体反応等を進行させる。反応後、上記のように、該装置の吸引機構を用いてウエルから液体を除去する。また、ウエル内を洗浄する際には、該装置の液体供給路により洗浄液等を複数のウエルに注入し、該装置の吸引機構を用いてウエルから除去する。このように、該装置の吸引機構を用いると、プレート中の複数のウエルから一度に、短時間に液体を除去することができ、本発明の方法を短時間にかつ容易に行うことができる。

【0049】

【実施例】本発明の方法をより詳細に説明するために、以下に実施例のプロトコルを示す。

実施例1 (第1抗体のみを用いる発明の方法) (図3参照)。

1. トランスファーバッファー(48mMトリス、39mMグリシン、20%メタノール、0.1%SDSおよび80%水)中に、PVDF(ポリビニリデンフルオリド)メンブレンを浸漬し、初期化した。

2. 1つのウエルの底面積が一定(24mm<sup>2</sup>)の5行3列の15のウエルから構成されるプレートを、初期化したPVDFメンブレン上に取り付け、ウエルの底面積がPVDFメンブレンで構成されるように固定した。

【0050】3. プレートの5行1列の各ウエルに、0.001%のNP-40を含むTBS中タンパクの総量が1μg/100μlの培養細胞(HeLa)溶液と、0.001%のNP-40を含むTBS中未知濃度のウサギIgG抗体の混合物を100μlずつ注入した(サンプル系列8)。

4. 同じプレートの別の5行1列の各ウエルに、0.001%のNP-40を含むTBS中タンパクの総量が1μg/100μlの培養細胞(HeLa)溶液を100μlずつ注入した(ネガティブコントロール系列9)。



【0051】5. 同じプレート別の5行1列の各ウェルに、0.001%のNP-40および1 $\mu$ g/100 $\mu$ lのBSAを含むTBS中に、0ng/100 $\mu$ l、2ng/100 $\mu$ l、4ng/100 $\mu$ l、8ng/100 $\mu$ lおよび16ng/100 $\mu$ lのウサギIgG抗体を、100 $\mu$ lずつ注入した。ウサギIgG抗体は、0.001%のNP-40および1 $\mu$ g/100 $\mu$ lのBSAを含むTBS中に8ng/100 $\mu$ lのウサギIgG抗体を、1.5M塩化ナトリウム水溶液を含む250mMトリスで希釈して所定の濃度に調整し、かつ総タンパク量が1 $\mu$ g/100 $\mu$ lとなるようにした(スタンダード系列10)。

【0052】6. プレート中の全てのウェルに、所定の液体の注入が完了した後、ウェルの底面すなわちメンブレンの裏面から陰圧約200mHgで約15秒間吸引した。

7. 次いで、プレート中の全てのウェルに、洗浄液(TBS-T:250mMトリス、1.5M塩化ナトリウム水溶液、1.0%ツイーン20)を注入し、その後ウェルの底面から陰圧約500mHgで約30秒間吸引した。

8. プレート中の全てのウェルに、ブロッキング液(TBS-T、4%BSA)を100 $\mu$ lずつ注入し、約30分間室温で静置した。その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約15秒間吸引し、次いで先の工程7と同様にしてプレート中の全てのウェルを洗浄した。

【0053】9. プレート中の全てのウェルに、ウサギIgG抗体に特異的に結合するFITC(蛍光イソチオシアネート)で標識された抗ウサギ抗体(1/4000FITC anti rabbit IgGの1.5mg/mlのTBS-T溶液)を100 $\mu$ lずつ注入し、約30分間室温で静置した。その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約30秒間吸引し、次いで先の工程7と同様にしてプレート中の全てのウェルを洗浄した。

10. PVDFメンブレンをプレートから取り外し、蒸留水で洗浄した後、約15分間室温で乾燥させた。その後、PVDFメンブレンを蛍光読み取り装置を用いて、各ウェルの底面に対応した大きさに吸着されたタンパクに結合した標識物質から発せられる蛍光を蛍光読み取り装置で読み取った。

【0054】11. サンプル系列8(5ウェル)から得られた平均蛍光強度、ネガティブコントロール系列9スタンダード系列の蛍光強度

IgG濃度 [ng/100 $\mu$ l]	2	4	8	16
蛍光強度 [カウント]	367.8	849.6	2316.4	4394.6

(5ウェル)から得られた平均蛍光強度、およびスタンダード系列10(5ウェル)の各濃度のウェルから得られた蛍光強度を基に、試料のタンパク量を算出した。なお、ネガティブコントロール系列9(5ウェル)から得られた平均蛍光強度は、IgGタンパクがメンブレン上に吸着されていないのに得られた蛍光強度であるので、メンブレンの持つ自己蛍光などのバックグラウンド蛍光と考えられる。

【0055】従って、以下の式：

(正味の試料の蛍光強度) = (サンプル系列から得られた平均蛍光強度) - (ネガティブコントロール系列から得られた平均蛍光強度)

に当てはめることにより、バックグラウンド蛍光を除いた試料の正味の蛍光強度が算出される。

【0056】また、スタンダード系列10(5ウェル)のうち、ウサギIgG濃度0ng/100 $\mu$ lのときに得られた蛍光強度は、ウサギIgGタンパクがメンブレン上に固相形成されていないのに得られた蛍光であるので、メンブレンの持つ自己蛍光とウサギIgGを希釈しているBSAの相互作用によるバックグラウンド蛍光と考えられる。したがって、以下の式：

(正味のスタンダードの蛍光強度) = (スタンダード系列から得られた蛍光強度) - (スタンダード系列0ng/100 $\mu$ lから得られた蛍光強度)

に当てはめることにより、バックグラウンド蛍光を除いたスタンダード系列の正味の蛍光強度が算出される。

【0057】本実施例1の結果は、

サンプル系列から得られた平均蛍光強度=4061.6  
カウント

ネガティブコントロール系列から得られた平均蛍光強度=563.6  
カウント

であったので、正味の試料の蛍光強度は、3498  
カウントである。

【0058】一方、本実施例1の結果は、スタンダード系列から得られたウサギIgG濃度0ng/100 $\mu$ lから得られた蛍光強度=378カウントであったため、IgGの濃度と対応する蛍光強度から近似式を算出するウサギIgG濃度が0ng/100 $\mu$ l以外の濃度のスタンダード系列の正味の蛍光強度は、表1に示すとおりである。

【0059】

【表1】

【0060】IgGの濃度と、対応する蛍光強度から直

線近似式を算出する。本実施例1の結果は、蛍光強度=

283.16×(IgG濃度)であった。したがって、試料の蛍光強度3498カウントを導入すると、試料のIgG濃度は12.4ng/100μg総タンパクと算出された。

【0061】実施例2(第1抗体および第2抗体を用いる発明の方法)(図4参照)

1. トランスファーバッファー(48mMトリス、39mMグリシン、20%メタノール、0.1%SDSおよび80%水)中に、PVDF(ポリビニリデンフルオリド)メンブレンを浸漬し、初期化した。

2. 1つのウェルの底面積が一定(24mm<sup>2</sup>)の6行3列の18のウェルから構成されるプレートを、初期化したPVDFメンブレン上に取りつけ、ウェルの底面積がPVDFメンブレンで構成されるように固定した。

3. プレートの6行1列の各ウェルに、0.001%のNP-40を含むTBS中タンパクの総量が1μg/100μlの培養細胞(HeLa)溶液を100μlずつ注入した(サンプル系列11)。

【0062】4. 同じプレートの別の6行2列の各ウェルに、0.001%のNP-40および1μg/100μlのBSAを含むTBS中に、0ng/100μlを含む5種類の濃度の測定項目の純粋な標品の溶液を、100μlずつ注入した。測定項目の純粋な標品は、0.001%のNP-40および10μg/10mlのBSAを含むTBS中に、1.5M塩化ナトリウム水溶液を含む250mMトリスで希釈して所定の濃度に調整

し、かつ総タンパク量が1μg/100μlとなるようにした(スタンダード系列12)。このスタンダード系列12は、同一プレート内では同じ種類の標品を注入し、測定項目が異なる毎に異なるプレート内にスタンダード系列を作成する。

【0063】5. プレート中の全てのウェルに、所定の液体の注入が完了した後、ウェルの底面すなわちメンブレンの裏面から陰圧約200mHgで約15秒間吸引した。

6. 次に、プレート中の全てのウェルに、洗浄液(TBS-T:250mMトリス、1.5M塩化ナトリウム水溶液、1.0%ツイーン20)を注入し、その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約30秒間吸引した。

【0064】7. 全プレート中の全ウェルに、ブロッキング液(TBS-T、4%BSA)を100μlずつ注入し、約30分間室温で静置した。その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約15秒間吸引し、次いで先の工程6と同様にしてプレート中の全てのウェルを洗浄した。

8. 測定項目の標品が吸着されたプレート中の全てのウェルに、対応する測定項目の標品に特異的に結合するウサギ抗体(第1抗体)の溶液を100μlずつ注入し、約30分間室温で静置した。

【0065】

【表2】

測定項目と、対応する測定項目の標品に特異的に結合するウサギ抗体の種類

測定項目	対応する測定項目の標品に特異的に結合するウサギ抗体の種類	溶液の溶媒
Cdk2	rabbit anti-Cdk2 IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
Cdk4	rabbit anti-Cdk4 IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
CyclinE	rabbit anti-CyclinE IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
P16	rabbit anti-P16 IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
P53	rabbit anti-P53 IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
P21	rabbit anti-P21 IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
P27	rabbit anti-P27 IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)
C-myc	rabbit anti-C-myc IgG	TBS (5mM DTT, 50%グリセロール)

【0066】その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約15秒間吸引し、次いで先の工程6と同様の操作を2回繰り返してプレート中の全てのウェルを洗浄した。

9. ビオチン化された抗ウサギ抗体(第2抗体)(1%BSAを含むTBS-T中1/100anti-rabbit IgG biotylated溶液)を、全てのプレートのウェルへ注入した。その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約15秒間吸引し、次いで先の工程6と同様の操作を2回繰り返してプレート中の全てのウェルを洗浄した。

【0067】10. 全プレート中の全ウェルに、FITC

標識ストレプトアビジン試薬(1/100 FITC strept avidin)を100μlずつ注入し、約30分間室温で静置した。その後、ウェルの底面から陰圧約500mHgで約15秒間吸引し、次いで先の工程6と同様の操作を3回繰り返してプレート中の全てのウェルを洗浄した。

11. PVDFメンブレンをプレートから取り外し、蒸留水で洗浄した後、約15分間室温で乾燥させた。その後、PVDFメンブレンを蛍光読み取り装置を用いて、各ウェルの底面に対応した大きさに吸着されたタンパクを標識した物質から発せられる蛍光を蛍光読み取り



装置で読み取った。

【0068】12. サンプル系列11(6ウェル)から得られた平均蛍光強度およびスタンダード系列12(6ウェル×2列)の各濃度のウェルから得られた蛍光強度を基に、試料のタンパク量を算出した。なお、スタンダード系列の濃度0(2ウェル)から得られた平均蛍光強度は、測定項目のタンパクがメンブレン上に吸着されていないのに得られた蛍光強度であるので、メンブレンの持つ自己蛍光などのバックグランド蛍光と考えられる。従って、以下の式：

(正味の試料の蛍光強度) = (サンプル系列から得られ

た平均蛍光強度) - (濃度0のスタンダード系列から得られた平均蛍光強度)

に当てはめることにより、バックグランド蛍光を除いた試料の正味の蛍光強度が算出される。

【0069】濃度の異なる測定項目の標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度、そこから得られた検量線を示すグラフ、測定した試料の蛍光強度と算出された測定項目の濃度を以下に示す。

【0070】(i) Cdk2の測定

【表3】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

Cdk2 (ng/ウェル)	0.00	2.00	5.00	10.00	15.00
蛍光強度 (カウント)	1285.59	1635.78	2116.93	3062.92	3735.63

【0071】(ii) Cdk4の測定

【表4】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

Cdk4 (ng/ウェル)	0.00	2.00	5.00	10.00
蛍光強度 (カウント)	1450.98	2314.64	3374.60	4776.19

【0072】(iii) CyclinEの測定

【表5】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

CyclinE (ng/ウェル)	0.00	20.00	50.00	100.00	150.00
蛍光強度 (カウント)	1920.53	5798.08	13318.06	27332.13	34423.52

【0073】(iv) P16の測定

【表6】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

P16 (ng/ウェル)	0.00	1.00	2.50	5.00	7.50	10.00
蛍光強度 (カウント)	419.68	523.54	764.21	1064.81	1309.83	1615.15

【0074】(v) P53の測定

【表7】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

P53 (ng/ウェル)	0.00	20.00	50.00	100.00	150.00	200.00
蛍光強度 (カウント)	1185.37	3232.07	6548.63	12491.52	19104.03	23137.77

【0075】(vi) P21の測定

【表8】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

P21 (ng/ ウェル)	0.00	20.00	50.00	100.00	150.00	200.00
蛍光強度 (カウント)	599.48	882.68	1101.06	1465.83	1966.69	2379.38

## 【0076】(vii) P27の測定

【表9】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

P27 (ng/ ウェル)	0.00	2.00	5.00	10.00	15.00	20.00
蛍光強度 (カウント)	503.99	823.53	1520.01	2254.76	2722.69	3528.19

## 【0077】(viii) C-mycの測定

【表10】

測定項目の濃度と標品のスタンダード系列から得られた蛍光強度

C-myc (ng/ ウェル)	0.00	2.00	5.00	10.00	15.00	20.00
蛍光強度 (カウント)	431.05	917.95	1964.85	3343.28	4687.79	5919.69

## 【0078】

【表11】

測定項目	試料の蛍光強度 (カウント)	試料中の量 (ng/ウェル)	試料中の濃度 (ng/1μg)
Cdk2	1121.8668	6.641511	6.641510509
Cdk4	413.61338	0.853098	0.853098498
CyclinE	551.37006	1.81718	2.022433168
P16	461.820014	3.762923	3.762923089
P53	266.630028	2.926445	2.926444763
P21	602.132563	63.84379	63.84378535
P27	476.490014	2.49423	2.494230426
C-myc	140.0750042	0.355846	0.410197873

## 【0079】

【発明の効果】本発明は、従って、細胞や組織を可溶化処理した試料を直接、疎水性多孔性膜に定量的に吸着させ、検出目的のタンパクに対して1種類のみの特異的抗体を用いて、短時間および少ない工程で行う多項目のタンパクの検出または定量が可能である。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法で用いるプレートへのスタンダードと試料の分注の配置を示す図である。

【図2】本発明の方法を行うのに好適な試料測定装置を示す(a)縦断面図および(b)横断面図である。

【図3】本発明の実施例1で用いるプレートへのスタンダードと試料の分注の配置を示す図である。

【図4】本発明の実施例2で用いるプレートへのスタンダードと試料の分注の配置を示す図である。

【図5】本発明の方法により得られたCdk2の検量線を示す図である。

【図6】本発明の方法により得られたCdk4の検量線を示す図である。

【図7】本発明の方法により得られたCyclinEの検量線を示す図である。

【図8】本発明の方法により得られたP16の検量線を示す図である。

【図9】本発明の方法により得られたP53の検量線を示す図である。

【図10】本発明の方法により得られたP21の検量線を示す図である。

【図11】本発明の方法により得られたP27の検量線を示す図である。

【図12】本発明の方法により得られたC-mycの検量線を示す図である。

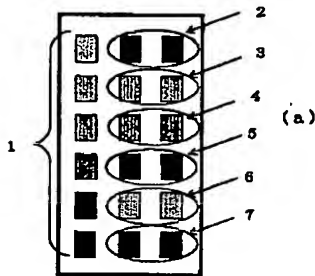
## 【符号の説明】

- 1 スタンダード系列
- 2 試料1
- 3 試料2
- 4 試料3
- 5 試料4
- 6 試料5

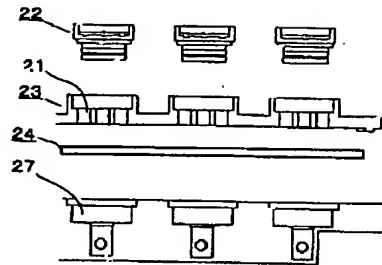
- 7 試料6  
 8 サンプル系列  
 9 ネガティブコントロール系列  
 10 スタンダード系列  
 11 サンプル系列  
 12 スタンダード系列  
 21 ウエル  
 22 液体供給路

- 23 プレート  
 24 疎水性多孔性膜  
 25 吸引機構  
 26 固相廃液管  
 27 吸引溝  
 28 オーバーフロー廃液管  
 29 排水溝

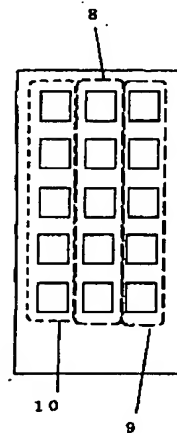
【図1】



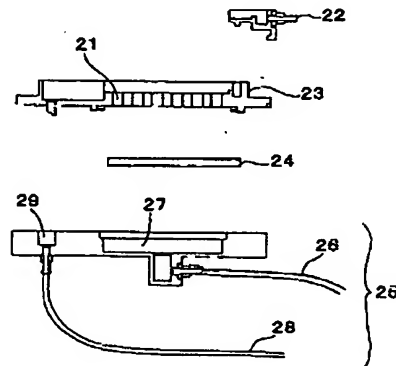
【図2】



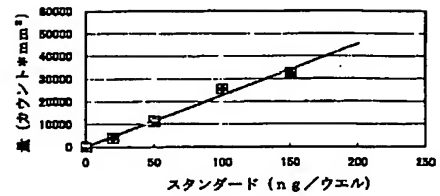
【図3】



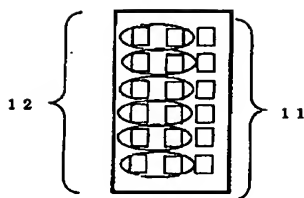
(b)



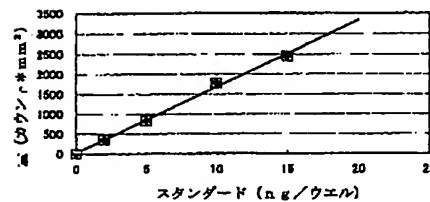
【図7】



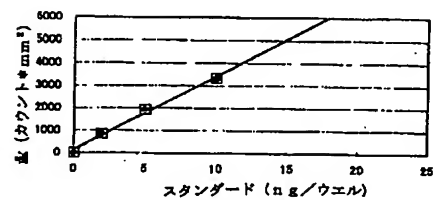
【図4】



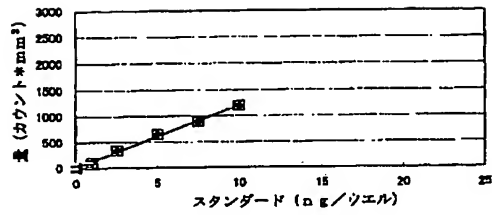
【図5】



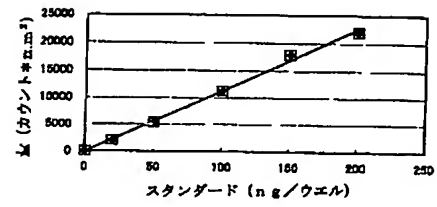
【図6】



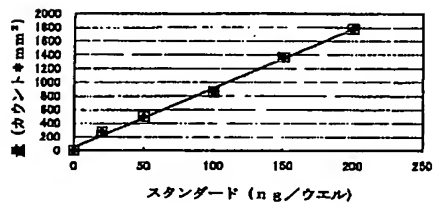
【図8】



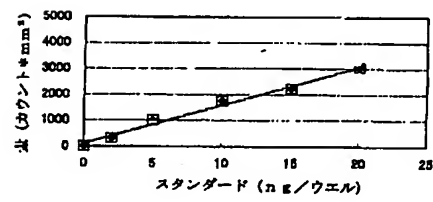
【図9】



【図10】



【図11】



【図12】

